

令和元年6月17日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20614

研究課題名(和文) 口腔癌臨床標本由来の変異NOTCH1の機能解析【新規標的治療開発に向けて】

研究課題名(英文) Functional analysis of NOTCH1 variants

研究代表者

青山 謙一 (AOYAMA, Ken-ichi)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：10647530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍および口腔粘膜組織は、122人のOSCC患者から採取した。50ドライバー遺伝子およびHNSCCおよび海外のOSCCにおいて頻繁に変異がみられる遺伝子を評価した。結果：平均深度は、腫瘍では168.6、正常粘膜では75.5であった。368のexon変異(8 splicingおよび22 Indelを含む)が観察された。TP53(44.6%)、FAT1(11.6%)、NOTCH1(11.6%)、USH2A(8.9%)、PIK3CA(5.4%)と既報データと類似していた。無増悪生存期間はFAT1およびNOTCH1変異患者では無変異患者よりも有意に長かった(P<0.01)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔がんの遺伝学的情報は解明されていないため、今後の治療戦略に好影響を与えられようと考えられる。とくに、口腔がんは標準的な化学療法が確立されていないため、手術療法以外の選択肢が増えることが考えられる。また、バイオマーカーの開発により、化学療法の選択的使用など医療経済にも好影響を与えることが予想される。侵襲度の少ない治療の開発は社会経済に好影響を与える可能性まで考えられる。以上より、学術的、社会的に大きな影響を与える可能性のある研究成果である。

研究成果の概要(英文)：Tumors and oral mucosa tissues were collected at the time of surgical resection from 122 treatment-naive OSCC patients, follow-up from 3.0 years to 8.3. Selected cancer-related genes (502,696 bases, 50 driver genes plus 39 genes which were frequently mutated in previous reports in HNSCC and OSCC in foreign countries) were evaluated. Results: The average depth of coverage were 168.6× in tumors and 75.5× in normal mucosae. 368 exonic mutations (including 8 splicing and 22 frameshift indels) were observed. The common mutations were found in TP53 (44.6%), FAT1 (11.6%), NOTCH1 (11.6%), USH2A (8.9%) and PIK3CA (5.4%), which was similar to data of foreign countries. Progression free survival was significantly longer for patients with FAT1 and NOTCH1-mutated tumors than for those with those of mutation-free tumors (P<0.01). Importantly, 27.8% of patients have gene mutations in NOTCH pathway, and these mutations were mostly located in the vicinity of NOTCH ligand binding region.

研究分野：口腔腫瘍学

キーワード：口腔がん NOTCH1 FAT1

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

NOTCH1 は白血病患者の過半数に活性化変異がみられ、血液腫瘍では Oncogene として知られるが、固形癌では腫瘍化・抗腫瘍作用双方が報告され、機能は解明されていない。近年、諸外国において頭頸部扁平上皮癌に高頻度の NOTCH1 変異が報告され、申請者らも口腔扁平上皮癌 84 例において、8 例・9.5% と高頻度に新規の変異を発見し、さらに変異患者群は有意に生存期間が長いことを示した。それらの変異による立体構造の変化により、NOTCH1 の活性低下が起こる可能性があることも示唆された (BBRC 2014)。この結果より、NOTCH1 の抑制による口腔癌の制御が可能であると考えられる。本計画では、臨床標本への癌関連因子の解析と、発見した NOTCH1 変異の影響を分子的に解明し、将来的に NOTCH1 抑制薬開発など臨床に直結する成果を得ることを目標とした。

#### 2. 研究の目的

(1) 臨床標本に対する大規模遺伝子変異解析による邦人口腔扁平上皮癌の遺伝学的特徴の解明  
(2) 発見した遺伝子変異の機能的意義の解明

#### 3. 研究の方法

本研究は、臨床標本に対する大規模遺伝子変異解析、口腔扁平上皮癌由来の変異 NOTCH1 発現細胞による In vitro、In vivo 解析を行った。

NOTCH 経路の遺伝子、HRAS 遺伝子を含む頭頸部扁平上皮癌で高頻度に変異が報告されている遺伝子 (Stransky ら 2011、India project 2014 など) に加え、固形癌でドライバー変異がみられるとされる遺伝子を含めたパネルを作成して次世代シーケンサーを用いて行った。

WT、臨床検体で見いだされた変異 NOTCH1 (A465T)、MOCK の三種類の cDNA を用いて HEK293 細胞にそれぞれ導入し、安定発現細胞 (WT 細胞、A465T 細胞、MOCK 細胞) を樹立した。これらの細胞株を用いて NOTCH1 の局在を Flow cytometry (FC) で、NOTCH1 の活性を western blot (WB)、NICD の局在を免疫蛍光法で評価し、NOTCH1 の下流の因子である HES1、HEY1 の mRNA 発現量を qPCR で評価した。腫瘍原性の解析として細胞増殖能力とヌードマウスへの異種移植を行った。

#### 4. 研究成果

P53、PIK3CA など既知のがん関連遺伝子については他の固形癌と類似したスペクトラムで変異がみられた。NOTCH 経路の遺伝子群に 28% と高頻度に変異がみられた。とくに、NOTCH1 変異についてはリガンド結合領域に集中していた。HRAS 変異については 1.8% と低頻度の変異が認められた (日本癌学会 2018 年、日本口腔外科学会)。

Flow cytometry において、変異 NOTCH1 の細胞膜局在は不安定になっていた。免疫蛍光法で WT 細胞の活性化 NOTCH1 は核内に認められたが、変異 NOTCH1 においては細胞質に認められた。qPCR において MOCK と比較し、WT では HES1、HEY1 の mRNA 発現量が有意に上昇していたが (3 倍、 $P < 0.01$ )、変異 NOTCH1 では有意に減少していた (37%、 $P < 0.01$ )。細胞増殖能力は MOCK 細胞と比較して WT 細胞は有意に ( $p < 0.01$ ) 細胞が上昇していたが、変異 NOTCH1 細胞においては有意に ( $p < 0.01$ ) 低下していた。ヌードマウスへの生着率は WT 細胞は 80% であったが、変異 NOTCH1 細胞では 0% であった (Oncology Reports 2017, Uchibori, Ota, et al)。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

To what extent does the EQ-5D-3L correlate with the FACT-H&N of patients with oral cancer during the perioperative period? Aoki T, Ota Y, Sasaki M, Aoyama KI, Akiba T, Shirasugi Y, Naito M, Shiroya T. International journal of clinical oncology 2018 年 11 月 [査読有り]

Longitudinal changes in the quality of life of oral cancer patients during the perioperative period. Aoki T, Ota Y, Suzuki T, Denda Y, Aoyama KI, Akiba T, Naito M, Arai T. International journal of clinical oncology 2018 年 7 月 [査読有り]

Lateral retropharyngeal lymph node metastasis from squamous cell carcinoma of the upper gingiva: A case report. Yamazaki H, Sasaki M, Aoyama KI, Suzuki T, Denda Y, Uchibori M, Nakanishi Y, Kojima R, Ota Y. Molecular and clinical oncology 8(1) 68-72 2018 年 1 月 [査読有り]

A case of Trousseau syndrome in a patient with advanced oral squamous cell carcinoma Ken-ichi Aoyama, Masashi Tamura, Masahiro Uchibori, Yasuhiro Nakanishi, Toshihiro Arai, Takayuki Aoki, Yuko Osawa, Akihiro Kaneko, Yoshihide Ota. Journal of Medical Case Reports 2018 年 [査読有り]

A mutation in NOTCH1 ligand binding region detected in patients with oral squamous cell carcinoma reduces NOTCH1 oncogenic effect. M. Uchibori, Ken-ichi Aoyama, Y. Ota,

K. Kajiwara, M. Tanaka, M. Kimura. Oncology Reports 38(4) 2237-2242 2017年10月 [査読有り]

Saliva pH affects the sweetness sense. Aoyama KI, Okino Y, Yamazaki H, Kojima R, Uchibori M, Nakanishi Y, Ota Y. Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.) 35 51-55 2017年3月 [査読有り]

Kikuchi-Fujimoto Disease with 18F-Fludeoxyglucose Uptake in Cervical Lymph Nodes on Dual-time-point Imaging Positron Emission Tomography/Computed Tomography Mimicking Malignant Disease. Aoyama KI, Otsuru M, Uchibori M, Ota Y. World journal of nuclear medicine 16(1) 68-70 2017年1月 [査読有り]

Relationship of sex, age, and preference level of sour food with sweetness sensitivity in young Japanese adults. Ken-ichi Aoyama, Y. Okino, H. Yamazaki, R. Kojima M. Uchibori, Y. Nakanishi, Y. Ota, A. Kaneko. Journal of Nutritional Health & Food Science 2017年 [査読有り]

〔学会発表〕(計 3件)

2018年度

・ Mutations found in Japanese oral squamous cell carcinoma、青山謙一、田嶋敦、太田嘉英、細道一善、木村穰、日本癌学会・学術大会

2017年度

・ Mutational landscape of Japanese oral squamous cell carcinoma、青山謙一、田嶋敦、太田嘉英、細道一善、木村穰、日本口腔外科学会総会・学術大会

2016年度

・ 生化学データとアンケート調査による、味覚感度の予測システムの開発、青山謙一、太田嘉英、日本公衆衛生学会総会

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：木村 穰

ローマ字氏名：KIMURA Minoru

研究協力者氏名：梶原 景正

ローマ字氏名：KAJIWARA Kagemasa

研究協力者氏名：太田 嘉英

ローマ字氏名：OTA Yoshihide

研究協力者氏名：穂積 勝人

ローマ字氏名：HOZUMI Katsuto

研究協力者氏名：田嶋 敦

ローマ字氏名：TAJIMA Atsushi

研究協力者氏名：細道 一善

ローマ字氏名：HOSOMICHI Kazuyoshi

研究協力者氏名：内堀 雅博

ローマ字氏名：UCHIBORI Masahiro

研究協力者氏名：大澤 侑子  
ローマ字氏名：OSAWA Yuko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。